

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie životního prostředí



Kristýna Kolouchová

Aktivity hydrolytických enzymů v procesu produkce bioplynu

Activity of hydrolytic enzymes in proces of prodution of biogas

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Kateřina Fliegerová, CSc.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Experimentální část této práce jsem prováděla na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., v Laboratoři anaerobní mikrobiologie.

V Praze, 30. 5. 2014

Podpis

Děkuji své školitelce RNDr. Kateřině Fliegerové, CSc. za zadání tématu, rady a vedení při vypracovávání této bakalářské práce. Také bych ráda poděkovala všem pracovníkům Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR za umožnění prostoru a prostředků pro vypracování bakalářské práce, hlavně Ing. Lence Štrosové za spolupráci v laboratoři, její ochotu a velice příjemný přístup.

Obsah

Obsah

Abstrakt

Abstract

Seznam zkratek

1. ÚVOD.....	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	3
2.1. BIOPLYN	3
2.2. HISTORIE VÝROBY BIOPLYNU	3
2.3. ANAEROBNÍ FERMENTACE.....	4
2.3.1. Fáze anaerobní fermentace	4
2.3.1.1. Hydrolýza	5
2.3.1.2. Acidogeneze	8
2.3.1.3. Acetogeneze.....	9
2.3.1.4. Metanogeneze.....	9
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	11
3.1. Materiály	11
3.2. Přístroje a vybavení.....	11
3.3. Stanovení α -amylasové a β -xylanasové aktivity	11
3.3.1. Použité chemikálie a roztoky	12
3.3.2. Příprava vzorku.....	12
3.3.3. Pracovní postup	12
3.3.4. Použitá metoda	13
3.3.5. Kalibrace.....	13
3.3.6. Výpočet aktivity	14
3.4. Stanovení β – glukosidasové aktivity.....	15
3.4.1. Použité chemikálie a roztoky	15
3.4.2. Příprava vzorku.....	15
3.4.3. Pracovní postup	15
3.4.4. Použitá metoda	15
3.4.5. Kalibrace.....	16
3.4.6. Výpočet aktivity	16
4. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	18
4.1. Aktivita α -amylasy.....	18
4.2. Aktivita β -glykosidasy	20
4.3. Aktivita β -xylanasy	22

5. ZÁVĚR.....	24
6. LITERATURA.....	25

Abstrakt

V této práci jsem se zaměřila na stanovení aktivit hydrolytických enzymů fungujících v hydrolytické fázi procesu produkce bioplynu. Konkrétně jsem měřila aktivity α -amylasy, β -xylanasy a β -glukosidasy. Vzorky pro měření aktivit enzymů byly poskytnuty zemědělskou bioplynovou stanicí AGRI FAIR s.r.o. v Deštné, která používá pro výrobu bioplynu kravskou kejdu a kukuřičnou siláž. Aktivitu enzymů jsem stanovovala v pěti různých fázích výroby – v kravském trusu z přilehlého kravína, v kravské kejdě z homogenizačního tanku pro dávkování bioplynové stanice, v kalu z vnějšího bioplynového fermentoru, v kalu z vnitřního bioplynového fermentoru a v kalu digestátu z digestační nádrže. Aktivita hydrolytických enzymů při výrobě bioplynu je klíčová, jelikož rozložitelnost vstupního materiálu je jejím limitujícím faktorem.

Aktivita α -amylasy měla nejvyšší hodnoty v kravském trusu a kravské kejdě, díky potravě obsahující vysoký podíl škrobu. V dalších fázích rovnoměrně klesá. Ve vnitřním fermentoru a digestátu je již substrát vyčerpán a aktivita je zde nulová. Její aktivita je téměř trojnásobná oproti β -glykosidase v kravském trusu a kravské kejdě, ale v posledních třech fázích β -glykosidasa aktivitu α -amylasy převýší a její hodnota je zde téměř ustálená. β -xylanasa má nejdříve zanedbatelné hodnoty aktivity, poté aktivita rovnoměrně roste a je nejvyšší ve vnějším fermentoru. Aktivity β -glykosidasy a β -xylanasy v digestátu jsou relativně vysoké, z čehož lze usuzovat, že v digestátu je ještě možné, aby docházelo k produkci bioplynu.

Abstract

In this work, the activities of hydrolytic enzymes, functioning in the hydrolytic stage of the production of biogas, have been determined. The activities of α -amylase, β -xylanase, and β -glucosidase have been measured in five samples collected from the following steps of biogas production: cow dung from the adjacent cowshed, cow manure from the homogenization tank for dosing biogas plant, digester sludge from the outside biogas fermenter, digester sludge from the inside biogas fermenter, and sludge of digestate from digestate tank. Samples for measurement of enzyme activities were provided by agricultural biogas station AGRI FAIR in Deštná, which uses for biogas production cow manure and corn silage. The activities of hydrolytic enzymes in the production of biogas are crucial, because degradability of feed material is the limiting factor.

Activity of α -amylase had highest value in cow dung and cow manure due to food containing high levels of starch. In subsequent phases it falls evenly. In the indoor digester and digestate it is already depleted substrate and the activity is at zero level. Its activity is almost three times higher than β -glucosidase in cow dung and cow manure, but in the last three stages of β -glucosidase activity exceeds α -amylase and its value is nearly stable. β -xylanase has negligible activity values first, then activity increased consistently and is highest in the outer fermenter. Activities of β -glucosidase and β -xylanase in the digestate are relatively high, suggesting that the digestate is still possible to result in the production of biogas.

Seznam zkratek

a	aktivita enzymu
A	absorbance vzorku
BPS	bioplynová stanice
Cdh	dehydrogenáza/acetyl-CoA komplex
CH ₃ -S-CoM.....	metyl koenzym M
CoA	koenzym A
CoB, HS-CoB.....	koenzym B
CoB-S-S-CoM.....	heterodisulfid koenzymu B s koenzymu M
CoM, HS-CoM.....	koenzym M
f	korelační faktor, reciproká hodnota směrnice kalibrační přímky k
FAF	tetrahydrometanopterin
GLU.....	α -D-glukosa
Hdr	heterodisulfidreduktasa
k	směrnice kalibrační přímky
kat.....	katal
MFR	metanofuran
ot/min	otáčky za minutu
PAHBAH	čínidlo z hydrazinu 4-hydroxybenzoové kyseliny, HCl a NaOH
POHBAH	čínidlo z hydrazinu 4-hydroxybenzoové kyseliny a HCl
PNP	paranitrofenol

1. ÚVOD

Bioplyn má v současné době největší perspektivu z oboru plyných biopaliv. Představuje vysoce hodnotné palivo. Svou výhřevností dosahuje okolo 70% výhřevnosti zemního plynu, což závisí na obsahu CO_2 a vody. Bioplyn obsahuje 45 – 75 % metanu, který lze v nečištěné formě použít pro výrobu elektrické energie. Zájem o tuto technologii se v posledních letech velice zvýšil, a to hlavně v zemědělství, kde má výroba bioplynu mnoho výhod a využití. Mezi hlavní výhody bioplynu patří jeho ekologická nezávadnost, využití biologicky rozložitelného odpadu, kejdy nebo kalů, nebo také snižování emisí skleníkových plynů. Pro zemědělce a čistírny odpadních vod je hlavní výhodou využívání energie vyrobené z bioplynu pro vlastní chod zařízení, eventuálně i vedlejší příjem výrobou tzv. zemědělské elektřiny. Výroba bioplynu je proces, který je velice šetrný k životnímu prostředí a jako odpadní produkt vniká tzv. digestát, který svými vlastnostmi představuje vysoce účinné přírodní hnojivo. Bioplyn se využívá zejména výrobě elektřiny pomocí kogeneračních zařízení, jejichž vedlejším produktem je tepelná energie, která může být výrobcem využita pro vytápění. Pro použití bioplynu do spalovacích motorů jako pohonnou hmotu motorových vozidel je nutno bioplyn přechistit a odstranit nežádoucí složky.¹

V České republice je budoucí využití energie bioplynu jasné, a to díky Evropské směrnici 2009/28/EC, jejímž cílem je do roku 2020 zvýšit v Evropě podíl tzv. „zelené“ elektrické energie z obnovitelných zdrojů na 20% z celkové produkce energie. Česká republika se zavázala k navýšení této energie na 13% a jedním z těchto obnovitelných zdrojů je právě bioplyn. Jeho podíl na „zelené“ energii činí pouhých 0,74%, avšak v posledních pěti letech došlo k markantnímu nárůstu elektrické energie vyprodukované bioplynovými stanicemi z 8,3 na 634 GWh, instalovaný výkon se zdvojnásobil (z 50 MWe na 118 MWe) a měl by se do roku 2015 navýšit na 140 – 150 MWe. Nejrychleji se v naší zemi rozšiřují bioplynové stanice (BPS), které zpracovávají organický odpad zemědělského provozu. Jejich počet vzrostl za posledních pět let o 237 a v roce 2013 dosáhl čísla 350.

Limitujícím faktorem výroby bioplynu je rozložitelnost vstupního materiálu. V procesu hydrolýzy se pomocí hydrolytických enzymů rozkládají polymery jako cukry, lipidy, proteiny apod. Každý polymer se rozkládá jinak obtížně a největší problém způsobuje polymerní struktura ligninocelulózy, která se nachází v rostlinných pletivech a je nerozložitelná anaerobními

mikroorganismy pracujícími ve fázi hydrolýzy.² Funkce hydrolytických enzymů a jejich aktivita je tedy faktorem určujícím výtěžnost a závěrečné složení bioplynu. Zkoumáním jejich aktivit v různých fázích procesu produkce bioplynu zjistíme jejich účinnost při rozkladu substrátu a poté můžeme jejich aktivitu případně ovlivňovat, např. přidáním určitého typu živin.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. BIOPLYN

Termínem bioplyn se označuje plyn vznikající biologickým procesem zvaným anaerobní fermentace, uváděná též pod pojmy anaerobní digesce, vyhnívání, biometanizace či biogasifikace. Do kategorie bioplynu patří bahenní plyny, skládkové plyny, plyny ze střev přežvýkavců a bioplyn vyráběný ve fermentorech.¹

2.2. HISTORIE VÝROBY BIOPLYNU

Úplný prapůvod prvního využívání bioplynu je velice neurčitý, jelikož nebylo možno rozeznat bez dostatečných znalostí rozdíl mezi bioplynem a unikajícím zemním plynem.¹ Nejstarší zmínka o bioplynu pochází z Asýrie z 10. století před naším letopočtem⁴, a poté se o něm znovu dovídáme až ve 2. polovině 18. století, kdy holandský fyzik Alessandro Volta prováděl pokusy se směsí bahenního plynu a vzduchu, kterou zažehnul elektrickou jiskrou.¹

Zájem o bioplyn poté projevil v roce 1844 i francouzský biolog, chemik a lékař Louis Pasteur. Prováděl pokusy s bioplynem a poprvé navrhl využít hnůj z pařížských provozů pro osvětlení města. Tento návrh se však neujal.¹

Koncem 19. století byla postavena první bioplynová stanice v Bombaji a ve městě Exter v Anglii se poprvé začal využívat bioplyn vznikající z čistírenských kalů k vytápění a svícení v čistírně odpadních vod. Tento způsob využití bioplynu se rozšířil hojně i do jiných států.

Počátkem 20. století se začaly používat modernější technologie pro výrobu bioplynu, tzv. vyhnívací nádrže nebo také Imhoffovy nádrže, pojmenované podle Karla Imhoffa.¹

Ve 20. letech 20. století se začalo využívat bioplynu jako pohonu elektrických motorů a vozidel a ve 30. letech započal intenzivní výzkum anaerobní fermentace.¹ Další vlny zájmu byly vzbuzeny hlavně díky zvyšování cen za fosilní paliva, environmentálních hrozeb a zintenzivnění produkce organického odpadu.⁴

V současné době existují po světě desítky milionů bioplynových stanic. Největší zastoupení mají v Číně a Indii. V Evropské Unii jsou největšími producenty bioplynu Německo, Rakousko, Dánsko a Švédsko.

2.3. ANAEROBNÍ FERMENTACE

Anaerobní fermentace je proces, při kterém směsná kultura mikroorganismů rozkládá organické látky za tvorby metanu, to vše bez přístupu kyslíku.¹ Zdrojem těchto organických látek jsou převážně čistírenské kaly, odpady živočišné a rostlinné výroby, odpady ze stravování a biologicky rozložitelné komunální odpady.⁵ Anaerobní digesce probíhá ve čtyřech na sebe navazujících fázích. Konečným produktem je stabilizovaná organická hmota nazývaná digestát a plynná směs oxidu uhličitého a metanu - bioplyn.

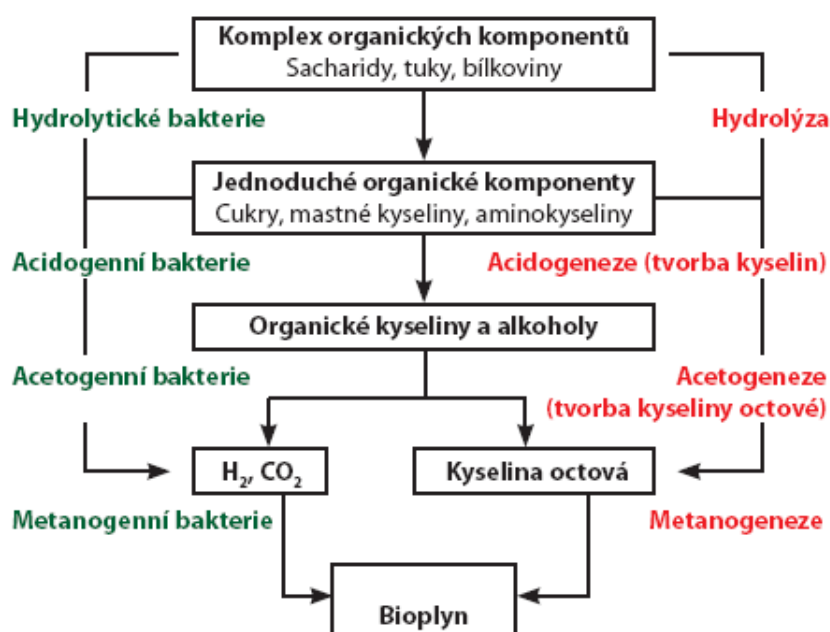
2.3.1. Fáze anaerobní fermentace

Anaerobní rozklad organických látek je proces, při kterém je vyžadovaná koordinovaná metabolická součinnost mnoha různých mikrobiálních skupin, podle kterých ho rozdělujeme na fázi hydrolýzy, acidogeneze, acetogeneze a metanogeneze.¹ První skupina zahrnuje bakterie hydrolyzační a fermentační, druhou skupinou jsou obligátní autogenní bakterie a třetí skupinu tvoří metanogeny.⁶ Nejzastoupenějšími bakteriemi v bioplynových fermentorech jsou Clostridia, Bacteroidetes a Bacilli.⁷

Primárně se pomocí obvyklých hydrolytických enzymů vysokomolekulární látky štěpí na jednoduché monomery a oligomery. Monomerní a oligomerní struktury slouží jako substrát pro tzv. syntrofní mikroorganismy, které je zpracovávají na jednoduché kyseliny, alkoholy a plyny, zastoupené hlavně oxidem uhličitým a vodíkem. Tyto mikroorganismy jsou schopné vytvářet plně

anaerobní podmínky pro rozvoj metanogenů a zároveň produkují hlavní substráty pro tvorbu metanu. Substráty pro tvorbu metanu jsou kyselina octová, ze které je metan vytvářen pomocí acetotrofních metanogenů a dále směs oxidu uhličitého a vodíku, která je přetvářena metanogeny hydrogenotrofními, viz obr. 1.

Vytváření metanu z oxidu uhličitého a vodíku zároveň snižuje obsah oxidu uhličitého ve výsledné směsi a obsah vodíku redukuje na úplné minimum. Zvýšený obsah vodíku v konečném složení bioplynu tedy indikuje narušení rovnováhy fáze acidogenní a metanogenní.¹



Obr. 1. Stručné schéma fází anaerobní fermentace¹⁷

2.3.1.1. Hydrolýza

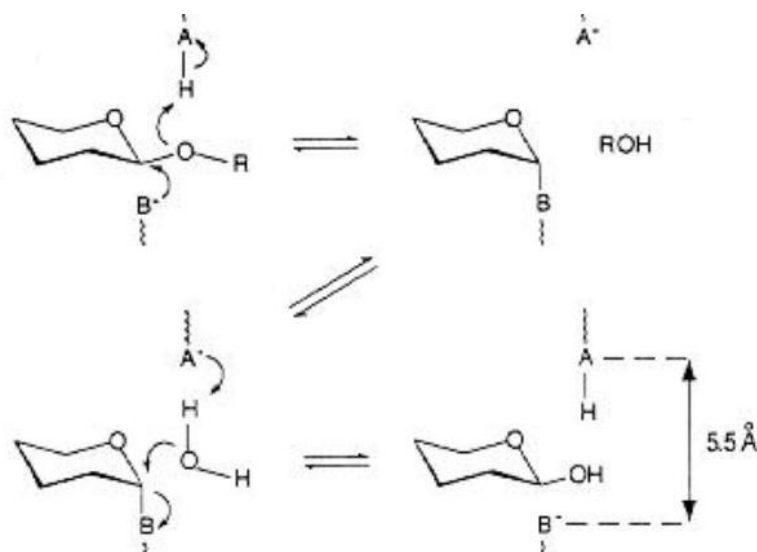
V této fázi dochází k hydrolytickému rozkladu makromolekulárních organických látek, rozpustných i nerozpustných ve vodě. Jsou jimi hlavně polysacharidy, lipidy a proteiny.⁶ Tyto látky se rozkládají na nízkomolekulární látky rozpustné ve vodě, jako jsou jednoduché cukry, aminokyseliny a alifatické karboxylové kyseliny.¹ Tento rozklad zajišťují extracelulární hydrolytické enzymy produkované převážně fermentačními bakteriemi.⁶

Důležitou podmínkou pro tuto fázi je dostatečná vlhkost, alespoň nad 50% hmotnosti. Dále je hydrolyza velice ovlivněna povahou rozkládaného materiálu, jelikož každý substrát se rozkládá různě rychle a obtížně, viz kapitola 1. Například cukry a škrob se přeměňují rychle, tuky pomalu a některé součásti rostlinných pletiv, například lignin, se nerozkládají vůbec.⁹ Z toho vyplývá, že složení vstupního materiálu a aktivita příslušných rozkladných enzymů ovlivňují dynamiku celkové produkce bioplynu a jsou i jejím limitujícím faktorem.

Ve vstupním materiálu jsou z těchto makromolekulárních látek nejvíce obsaženy polysacharidy, které mají majoritní podíl na výrobě bioplynu. Lipidy a proteiny mají vysokou výtěžnost, ale nejsou zde tolik zastoupeny. Proteiny zároveň při rozkladu produkují dusík a síru, zejména ve formě amoniaku, amonných solí a sulfanu, které jsou hlavním zdrojem problémů.¹

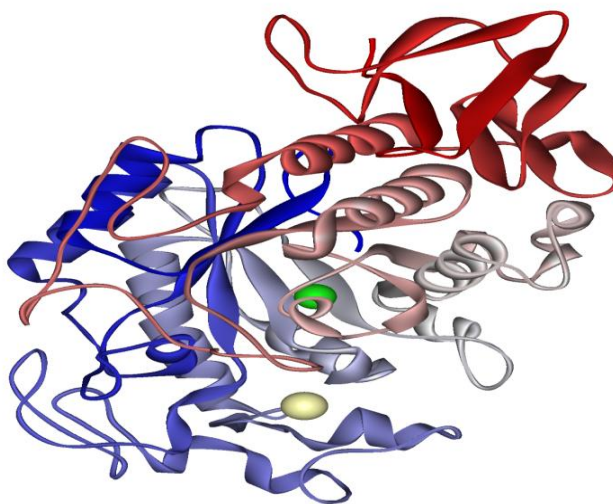
Hydrolytické enzymy, tzv. hydrolasy, jsou proteiny, které katalyzují rozklad vazeb pomocí vody. Jejich podtřídy jsou tvořeny podle typu vazby, kterou příslušný enzym štěpí.¹⁰ Mohou rozkládat např. esterové vazby (esterasy), glykosidické vazby (glykosidasy), amidové vazby (amidasy), aminové vazby (aminohydrolasy), vazby peptidické (peptidasy, proteinasy) apod.¹¹

Enzymy, jejichž aktivita je předmětem této bakalářské práce, patří do třídy glykosidas. Mechanismus hydrolyzy těchto tří enzymů je v zásadě stejný, viz obr. 2. Nejprve je protonován kyslík glykosidické vazby, poté karboxylová skupina atakuje substrát za vzniku kovalentního intermediátu, který by se dal popsat jako adukt glykosyl-enzym a glykosidická vazba se tímto rozštěpí. Vzniklý glykosyl-enzym se hydrolyzuje pomocí molekuly vody, takže závěrečný produkt má stejnou stereoisomerii jako výchozí látka.¹²



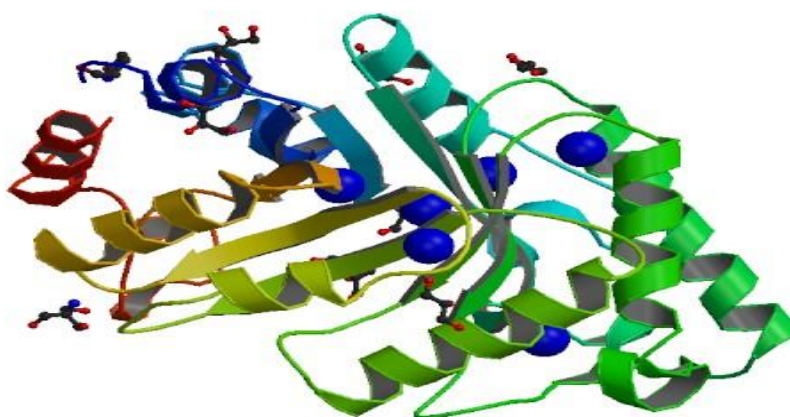
Obr. 2. Mechanismus enzymatické hydrolyzy¹²

α -amylasa (EC 3.2.1.1), produkovaná bakterií *Aspergillusoryzae*,¹² katalyzuje hydrolýzu α -1,4-glykosidické vazby. Tato vazba byla nalezena v polysacharidech, amylose a amylopektinu, tvořících hlavní stavební složku škrobu.¹³



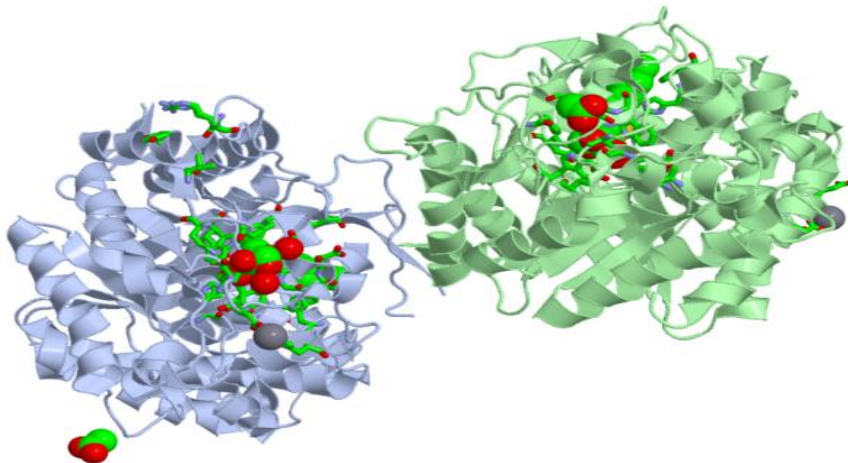
Obr. 3. : Struktura enzymu α -amylasy. Zelená – ion Cl^- , žlutá – ion Mg^{2+} ¹⁸

β -xylanasa (EC 3.2.1.8), produkovaná bakterií *Bacillus circulans*,¹² katalyzuje hydrolýzu β -1,4-xylosidické vazby uvnitř molekuly xylanu. Xylan je polysacharid, nalezený v buňkách buněčných stěn rostlin a jeho rozkladem vznikají β -1,4-xylosil residua.¹⁴



Obr. 4. : Schéma β -xylanasy. Modrá – ionty Na^{2+} ²⁰

β -glukosidáza (EC 3.2.1.21), katalyzuje hydrolýzu aryl a alkyl- β -glykosidických residuí. Tento enzym byl nalezen v mnoha organismech a jeho hlavní funkcí je štěpení cellobiosy, což je meziprodukt vznikající při rozkladu biomasy.¹⁵



Obr. 5. : Struktura β -glukosidasy.¹⁹

2.3.1.2. Acidogeneze

Během fáze acidogeneze jsou produkty hydrolýzy rozkládány na jednodušší organické látky, kterými jsou hlavně těkavé organické kyseliny, alkoholy, oxid uhličitý a molekulární vodík.

Mikroorganismy, které pracují ve fázi acidogeneze, patří do stejné skupiny mikroorganismů jako ve fázi hydrolýzy a jsou to tzv. mikroorganismy fermentační. Fermentací výše zmíněných látek dostáváme řadu výsledných redukovaných produktů, jejichž poměr je závislý na parciálním tlaku vodíku ve směsi. Při vyšším tlaku se tvoří vyšší organické kyseliny, jako kyseliny propionová, valerová, máselná a etanol, a při nižším tlaku hlavně kyselina octová, oxid uhličitý a vodík.

Převážná část toku uhlíku probíhá přímo od fermentačních mikroorganismů k metanogenům. Pouze 20 až 30 % uhlíku je transformováno na meziprodukty, jako jsou zmíněné organické kyseliny s vyšším počtem uhlíků, než má kyselina octová, a jiné.⁶

2.3.1.3. Acetogeneze

Ve fázi acetogeneze se meziprodukty z acidogenní fáze, jako jsou těkavé organické kyseliny a alkoholy, přeměňují na kyselinu octovou a vodík. Důležitou podmínkou pro tuto fázi je nízká koncentrace vodíku, která je přirozenou cestou zajištěna metanogenními bakteriemi. Tyto bakterie, pracující ve fázi metanogeneze, vodík ze systému odčerpávají na výrobu metanu. Z této důležité podmínky vyplývá, že se tyto fáze musí překrývat.

Mikroorganismy, které fungují ve fázi acetogeneze, se nazývají obligátní acetogenní bakterie. Jejich produktivita je závislá na bakteriích metanogenních a žijí ve striktně anaerobním prostředí.⁶

2.3.1.4. Metanogeneze

Metanogeneze je závěrečná fáze anaerobní fermentace. Pomocí metanogenních bakterií se zde vytváří metan z kyseliny octové, vodíku a oxidu uhličitého, díky čemuž se vytváří finální složení bioplynu.

Mikroorganismy, které produkují metan, se nazývají metanogeny. Podle substrátu je dělíme na metanogeny acetotrofní a hydrogenotrofní, viz kapitola 2.1.4.

Produkce metanu z kyseliny octové, nebo také v menší míře ze zbytkových meziproduktů, jakými jsou metanol, metylamin nebo dimetylsulfid, probíhá díky metanogenům acetotrofním. Mechanismus této přeměny začíná aktivací acetyl skupiny. Poté dehydrogenáza/acetyl-CoA komplex (Cdh) štěpí aktivovanou kyselinu octovou na metylovou a karbonylovou skupinu. Metylová skupina je přenesena na koenzym M (HS-CoM) za vzniku metylkoenzymu M ($\text{CH}_3\text{-S-CoM}$), ze kterého je následně odštěpen metan díky elektronům, předaným koenzymem B (HS-CoB) za vzniku heterodisulfidu CoB-S-S-CoM . Tato sloučenina je následně štěpena zpět na hydrogensulfid kofaktory pomocí heterodisulfid reduktázy (Hdr). Mechanismus přeměny metanolu, metylaminu a dimetylsulfidu probíhá na stejném principu, jako u kyseliny octové.¹⁶

Druhá cesta produkce metanu je prostřednictvím hydrogenotrofních metanogenů, která je ve skutečnosti jednou z možností anaerobní respirace mikroorganismů. Jde tedy o redukci oxidu uhličitého na metan.³ Nejprve dojde k aktivaci CO_2 pomocí metanofuranu (MFR) a vznikne formyl MFR. Poté dojde k reakci formylu s tetrahydrometanopterinem (FAF) za vzniku metylen-FAF. Pomocí molekuly vodíku je metylen-FAF redukován na metyl-FAF a metyl je poté přenesen na CoM za vzniku metyl-CoM. Metyl-CoM je redukován pomocí metylreduktáz na metan a CoM.⁸

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Materiály

Vzorky pro měření aktivit enzymů byly poskytnuty zemědělskou bioplynovou stanicí AGRI FAIR s.r.o. v Deštné, která používá pro výrobu bioplynu kravskou kejdu a kukuřičnou siláž. Proces výroby bioplynu probíhá ve dvouplášťovém fermentoru, jehož části jsou označeny jako vnější a vnitřní fermentor. Z bioplynové stanice bylo odebráno 5 následujících vzorků: kravský trus z přilehlého kravína, kravská kejda z homogenizačního tanku pro dávkování BPS, kal z vnějšího fermentoru, kal z vnitřního fermentoru a kal digestátu z digestační nádrže.

3.2. Přístroje a vybavení

- 1) Vodní lázeň – Y 28 grant, TW 12 jalebo, ML W W 10
- 2) Spektrofotometr - ThermospectronicBiomate
- 3) Centrifuga - MLW K 23D, MLW K 23, MLW K 24
- 4) Termostat - TCH 100 Laboratorní přístroje Praha
- 5) Mikropipety - Nichipet EX Nichiryo
- 6) Špičky - Neptune

3.3. Stanovení α -amylasové a β -xylanasové aktivity

3.3.1. Použité chemikálie a roztoky

Běžné chemikálie byly získány od firem Lachema Neratovice, P-LAB, s.r.o. Praha, Pliva-Lachema a.s. Brno, Sigma (USA) a TopBio (ČR).

Hydrazid 4-hydroxybenzoové kyseliny byl zakoupen u firmy AcrosOrganics (Belgie).

- 1) fosfátový pufr 100 mM (pH 7,0)
- 2) 0,5 % zásobní roztok substrátu (sonifikovaný xylan – pro xylanasu, škrob – pro amylasu)
- 3) PAHBAH činidlo – rozpuštěno 5 g hydrazidu 4-hydroxybenzoové kyseliny ve 100 ml 0,5 M HCl - činidlo POHBAH, které je nutné skladovat při 4°C v tmavé láhvi. Před každým pokusem byl vždy připraven čerstvý pracovní roztok PAHBAHu smícháním 1 objemu POHBAH se 4 objemy 0,5 M NaOH.
- 4) 0,3 M ZnSO₄
- 5) 0,3 M Ba(OH)₂
- 6) Roztok xylosy (c=100 µg/ml) – připraven desetinasobným zředěním zásobního roztoku xylosy o koncentraci c=100 mg/100 ml
- 7) Zásobní roztok glukosy (c=100 µg/ml)

3.3.2. Příprava vzorku

Z každého z výše zmíněných pěti vzorků, viz kapitola 3.1., jsou naváženy 3 g kalu, které se následně zředí 3 ml deionizované vody. Takto připravené vzorky se stočí na centrifuze po dobu 10 minut při 6000 ot/min.

3.3.3. Pracovní postup

Do zkumavek se napipetuje 0,2 ml pufru, 0,1 ml substrátu a 0,1 ml vzorku a směs se důkladně zamíchá na vortexu. Pro každý enzym se připraví 3 experimentální replikáty a 2 slepé vzorky. Poté jsou vzorky, kromě slepých, inkubovány 60 min při teplotě 40°C. Aktivita enzymu ve

slepých vzorcích se ihned po přidání experimentálního vzorku zastaví přidavkem 0,3 M ZnSO_4 a 0,3 M Ba(OH)_2 . Po inkubaci jsou všechny vzorky zastaveny stejně jako vzorky slepé a stočeny na centrifuze po dobu 10 minut při 4000 ot/min.

V takto získaném supernatantu je stanovována koncentrace redukujících zbytků polysacharidů. Do připravených zkumavek se napipetuje 0,1 ml supernatantu, k němu se přidá 0,2 ml destilované vody a 0,9 ml pracovního roztoku PAHBAHu a takto připravené vzorky se zahřívají 10 minut při teplotě 100°C.

3.3.4. Použitá metoda

Aktivita α -amylasy a β -xylanasy je měřena metodou podle M. Levera (1977). Při této metodě je měřen přírůstek koncentrace redukujících skupin polysacharidů, který je přímo úměrný aktivitě příslušných enzymů. Redukující zbytky polysacharidů reagují s kyselinou 4-hydroxybenzoovou za tvorby barevného produktu, jehož koncentrace je úměrná intenzitě zbarvení a proto je měřena spektrofotometricky při vlnové délce $\lambda=410\text{nm}$. Následně z naměřené absorbance spočítáme koncentraci pomocí směrnice kalibrační přímky.

3.3.5. Kalibrace

Pro oba enzymy se připraví šest roztoků cukrů o různých koncentracích. K výpočtu aktivity amylasy používáme ke kalibraci standardní roztok glukosy a pro xylanasu používáme standardní roztok xylosy. Do zkumavek se připraví roztoky dle *tabulky 1*.

Tabulka 1. : Příprava standardních roztoků cukru

č. roztoku	1	2	3	4	5	6
Objem přidávaného standardního roztoku cukru (ml)	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,0
Objem přidávané destilované vody (ml)	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0

Takto připravené standardní roztoky se zahřívají po dobu 10 min při teplotě 100°C na vodní lázni. Poté se změří jejich absorbance při vlnové délce $\lambda=410$ nm v 0,5 cm kyvetách. Pro každý roztok měříme absorbanci ve třech replikátech.

3.3.6. Výpočet aktivity

Aktivita enzymů, a [$\mu\text{g} \cdot \text{hod}^{-1} \cdot \text{ml}$], byla vypočtena dle rovnice:

$$a = \frac{f \cdot A \cdot n \cdot l}{t}$$

(1)

f ... korelační faktor, reciproká hodnota směrnice kalibrační přímky k

A ... absorbance vzorku

n ... ředění vzorku

l ... šířka kyvety, [cm]

t ... doba inkubace, [hod]

3.4. Stanovení β –glukosidasové aktivity

3.4.1. Použité chemikálie a roztoky

1. fosfátový pufr 100 mM (pH 6)
2. 0,2 % substrát (PNP- β -D-glukopyranosid)
3. 2 % Na_2CO_3
4. Roztok p-nitrofenolu ($c=30 \mu\text{g/ml}$) - připraven desetinasobným zředěním zásobního roztoku p-nitrofenolu o koncentraci $c=30 \text{ mg/100 ml}$

3.4.2. Příprava vzorku

Z každého z výše zmíněných pěti vzorků, viz kapitola 3.1., se naváží 3 g kalu, který se následně zředí 3 ml dionizované vody. Takto připravené vzorky se stočí na centrifuze po dobu 10 minut při 6000 ot/min. Po stočení se odebere 0,2 ml supernatantu a přidá 0,6 ml destilované vody.

3.4.3. Pracovní postup

Do zkumavek se připraví směs napipetováním 0,1 ml vzorku, 0,2 ml pufru a 0,1 ml substrátu PNP- β -D-glukopyranosidu a zkumavky se promíchají na vortexu. Pro každý z pěti typů vzorků si připravíme 3 experimentální replikáty a 2 slepé vzorky. Vzorky, kromě slepých, jsou poté inkubovány 60 min při 40°C. Slepé vzorky se ihned po přidání substrátu zastaví reakcí s 0,8 ml 2 % Na_2CO_3 . Po inkubaci se experimentální vzorky zastaví stejně jako u vzorků slepých, a to přidávkem 0,8 ml 2 % Na_2CO_3 . Všechny vzorky se následně stočí na centrifuze po dobu 10 minut při 4000 ot/min.

3.4.4. Použitá metoda

Aktivita β –glukosidázy se stanovuje metodou podle Biodochky a kol. (1992). Je založena na principu měření přírůstku volného p-nitrofenolu (PNP). Tento přírůstek koncentrace je přímo

úměrný aktivitě enzymu. PNP má žluté zbarvení, díky čemuž můžeme měřit absorbanci vzorků při vlnové délce $\lambda=410$ nm. Pro výpočet aktivity enzymu použijeme porovnání s kalibrační křivkou.

3.4.5. Kalibrace

Do šesti zkumavek se připraví standardní roztoky p-nitrofenolu o různých koncentracích podle *tabulky 2*.

Tabulka 2.: příprava standardních roztoků p-nitrofenolu

č. roztoku	1	2	3	4	5	6
Objem přidaného roztoku p-nitrofenolu (ml)	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,0
Objem přidané destilované vody (ml)	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0

Z těchto roztoků se odebere 0,4 ml a přidá 0,8 ml 2% Na_2CO_3 a poté se změří absorbance při vlnové délce $\lambda=410$ nm v 0,5 cm kyvetě. Pro každý roztok měříme absorbanci ve třech replikátech.

3.4.6. Výpočet aktivity

Aktivita enzymu, $a[\mu\text{g} \cdot \text{hod}^{-1} \cdot \text{ml}]$, byla vypočtena podle rovnice (1).

Při kalibraci byl použit PNP, ale při enzymatické reakci se uvolňuje glukosa (GLU), proto bylo nutno přepočítat vzniklý faktor z kalibrace $f(\text{PNP})$ na $f(\text{GLU})$ podle rovnice:

$$f (GLU) = \frac{f (PNP) \cdot M_r (GLU)}{M_r (PNP)}$$

(2)

f ... korelační faktor, reciproká hodnota směrnice kalibrační přímky k

M_r ... relativní molekulová hmotnost

$M_r (PNP) = 139,11$ $M_r (GLU) = 180,16$

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

V odebraných vzorcích byla stanovena aktivita hydrolytických enzymů α -amylasy, β -xylanasy a β -glukosidasy.

Výsledky a naměřené hodnoty absorbancí jsou zpracovány v tabulkách, aktivity enzymů jsou znázorněny graficky.

4.1. Aktivita α -amylasy

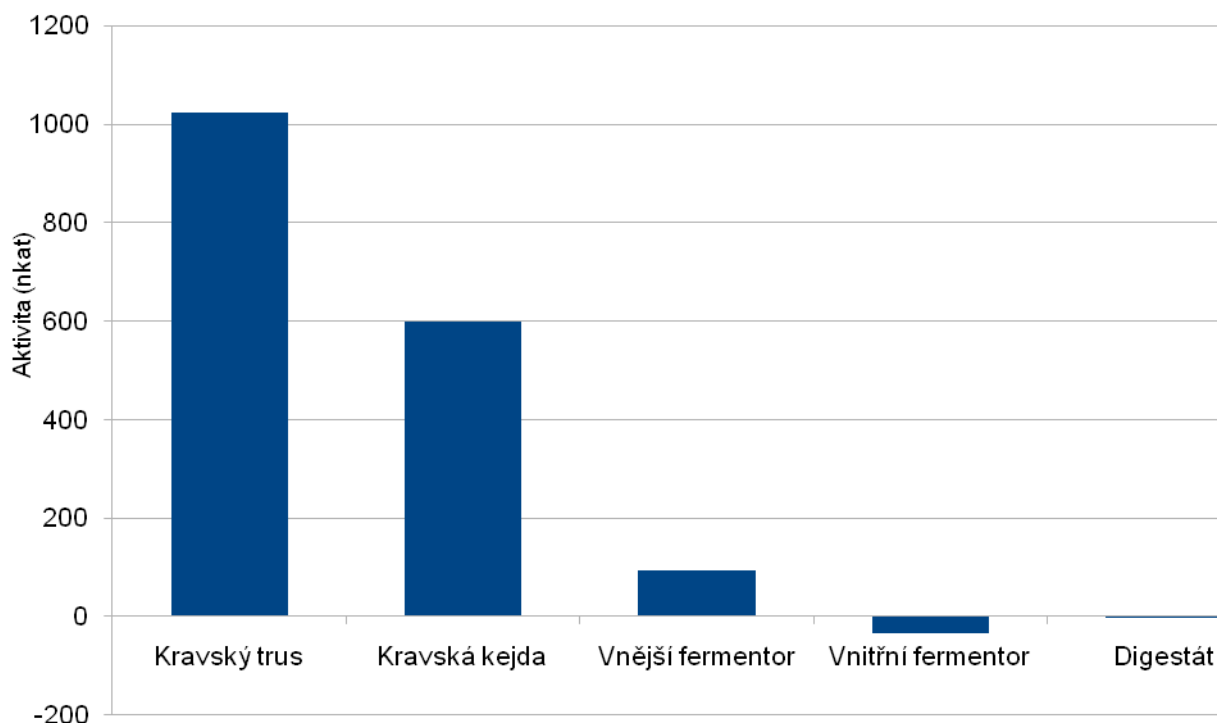
Tabulka 3.: Naměřené hodnoty absorbancí vzorků ke stanovení amylasové aktivity

	Absorbance				
	Slepý vzorek		Vzorek		
Číslo měření	1	2	1	2	3
Kravský trus	0,217	0,320	1,778	1,730	1,929
Kravská kejda deštná	0,324	0,376	1,032	1,427	1,304
Vnější fermentor	0,124	0,125	0,294	0,225	0,270
Vnitřní fermentor	0,213	0,174	0,169	0,135	0,113
Digestát	0,174	0,153	0,138	0,153	0,180

Tabulka 4. : Výsledná aktivita α -amylasy

	Absorbance		Aktivita	
	$\bar{O}A_{\text{slepý vzorek}}$	$\bar{O}A_{\text{vzorek}}$	$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	nkat
Kravský trus	0,268	1,812	663,188	61353,175
Kravská kejda deštná	0,350	1,254	388,477	35938,932
Vnější fermentor	0,124	0,263	59,496	5504,101
Vnitřní fermentor	0,193	0,139	-23,412	-2165,874
Digestát	0,163	0,157	-2,792	-258,315

Aktivita α – amylasy



Obr. 6: Změny amylasové aktivity ve fázích procesu produkce bioplynu

Aktivita α -amylasy byla měřena na principu přímé úměrnosti mezi aktivitou enzymu a přírůstkem koncentrace redukujících skupin polysacharidů. Tyto redukující skupiny vznikají enzymatickým rozkladem škrobu, který je vhodný substrát pro enzym α - amylasu.

Aktivita α -amylasy je nejvyšší v kravském trusu, což svědčí o tom, že dobytek byl v době odběru vzorků krměn koncentrovaným krmivem s vysokým obsahem škrobu. Aktivita enzymu postupně klesá, vysoké hodnoty byly naměřeny logicky i v kravské kejdě, ale v dalších fázích procesu výroby bioplynu je aktivita amylasy nízká. Vzhledem k vysokému obsahu škrobu v kukuřičné siláži je tento údaj překvapující, nebo by se dalo očekávat, že na počátku fermentace ve vnějším fermentoru budou aktivity amylasy ještě vysoké.

Ve vnitřním fermentoru a digestátu je aktivita v záporných hodnotách, což značí, že aktivita α -amylasy je nulová. Absorbance v těchto vzorcích dá po zprůměrování nižší hodnotu než je

průměrná hodnota slepého vzorku a z toho důvodu je výsledná aktivita záporná. Znamená to, že koncentrace příslušných oligosacharidů je ve vzorcích nulová a jde tedy jen o kolísání naměřených hodnot absorbance samotné matrice.

4.2. Aktivita β -glykosidasy

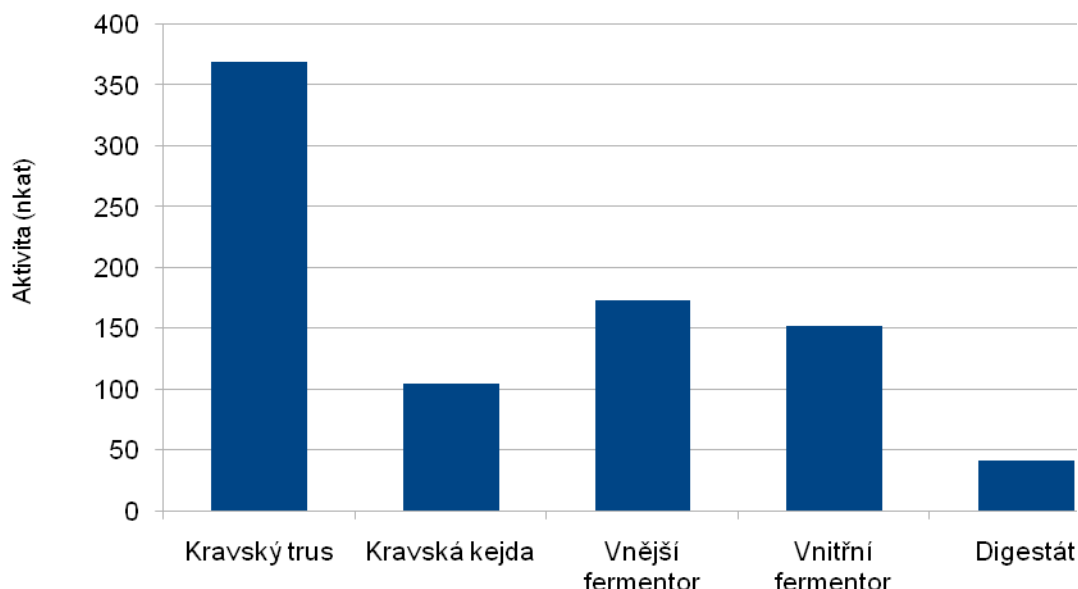
Tabulka 5.: Naměřené hodnoty absorbancí vzorků ke stanovení glykosidasové aktivity

	Absorbance				
	Slepý vzorek		Vzorek		
Číslo měření	1	2	1	2	3
Kravský trus	0,100	0,112	0,322	0,319	0,325
Kravská kejda	0,105	0,070	0,146	0,153	0,146
Vnější fermentor	0,168	0,184	0,273	0,273	0,285
Vnitřní fermentor	0,158	0,166	0,246	0,259	0,248
Digestát	0,123	0,126	0,141	0,150	0,155

Tabulka 6.: Výsledná aktivita β -glukosidasy

	Absorbance		Aktivita	
	$\bar{O} A_{\text{slepý vzorek}}$	$\bar{O} A_{\text{vzorek}}$	$\mu\text{g.ml}^{-1}.\text{h}^{-1}$	Nkat
Kravský trus	0,106	0,322	239,792	369,729
Kravská kejda	0,087	0,148	67,534	104,129
Vnější fermentor	0,176	0,277	112,125	172,882
Vnitřní fermentor	0,162	0,251	98,803	152,342
Digestát	0,124	0,149	26,829	41,366

Aktivita β -glukosidasy



Obr. 7: Změny glukosidásové aktivity ve fázích procesu produkce bioplynu

Aktivita β -glykosidasy je měřena na stejném principu jako aktivita α - amylasy.

β -glykosidasa je výrazně nejaktivnější v kravském trusu. Její aktivita je zde však téměř třikrát menší než aktivita α - amylasy. V dalších fázích je již aktivita o mnoho nižší. Ve vnějším fermentoru byl zaznamenán nárůst aktivity, což lze vysvětlit tím, že fermentačním bakteriím byl poskytnut čerstvý substrát ve formě kukuřičné siláže. Poměrně vysoká aktivita byla naměřena i ve vnitřním fermentoru, což svědčí o tom, že substrát ještě nebyl vyčerpán. V digestátu pak byly naměřeny nejnižší, nikoli však nulové hodnoty. Lze z toho usuzovat, že digestát má ještě potenciál k produkci bioplynu.

4.3. Aktivita β -xylanasy

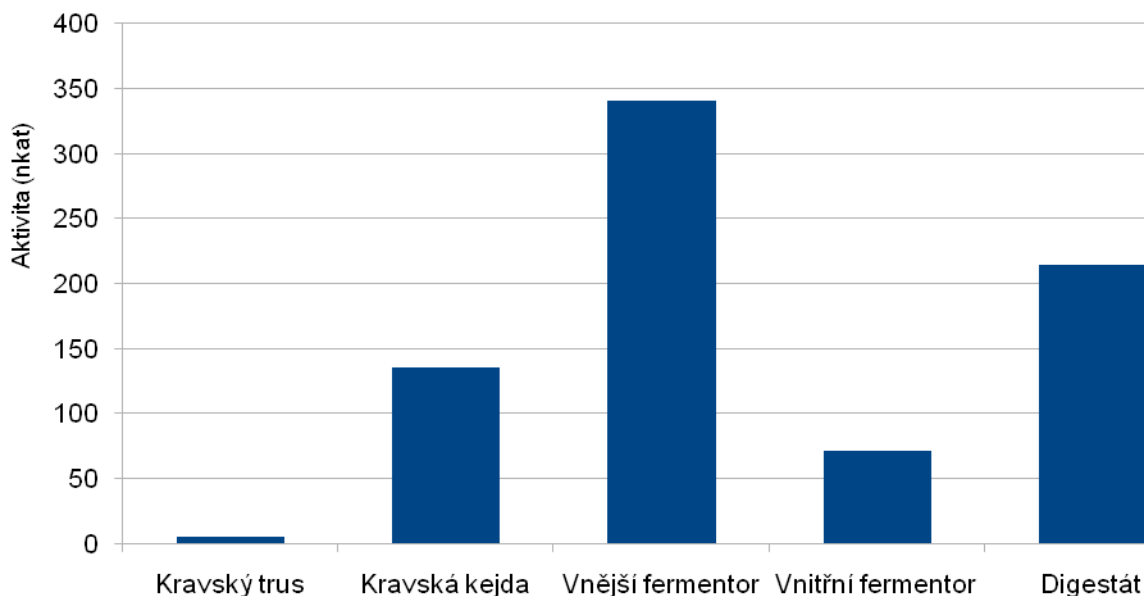
Tabulka 7.: Naměřené hodnoty absorbancí vzorků pro výpočet xylanase aktivity

	Absorbance				
	Slepý vzorek		Vzorek		
Číslo měření	1	2	1	2	3
Kravský trus	187	160	199	187	150
Kravská kejda	146	168	289	308	306
Vnější fermentor	178	209	574	434	661
Vnitřní fermentor	339	288	395	425	348
Digestát	234	224	499	409	461

Tabulka 8.: Výsledná aktivita β -xylanasy

	Absorbance		Aktivita	
	$\bar{O} A_{\text{slepý vzorek}}$	$\bar{O} A_{\text{vzorek}}$	$\mu\text{g.ml}^{-1}.\text{h}^{-1}$	Nkat
Kravský trus	0,173	0,178	2,619	290,822
Kravská kejda	0,157	0,301	73,013	8105,488
Vnější fermentor	0,193	0,556	183,968	20423,203
Vnitřní fermentor	0,313	0,389	38,450	4268,515
Digestát	0,229	0,456	115,265	12796,164

Aktivita β -xylanasy



Obr. 8: Změny xylanasové aktivity ve fázích procesu produkce bioplynu

U enzymu xylanasy byly naměřeny nejvyšší hodnoty ve vnějším bioplynovém fermentoru, což svědčí o tom, že mikroorganismy se schopností rozkládat xylan, které jsou vzhledem k naměřeným aktivitám zřetelně přítomny v kravské kejdě, po přísunu čerstvého substrátu (kukuřičné siláže) zvyšují aktivitu či množství buněk. Z grafu by se dalo usuzovat, že k hlavní degradaci xylanu dochází již ve vnějším fermentoru, neboť aktivita xylanasy ve vnitřním fermentoru výrazně klesá. Vysoký nárůst hodnoty xylanasy v digestátu nedokážu logicky zdůvodnit, ale opět tato naměřená hodnota svědčí o tom, že digestát není plně vyčerpán, zůstává v něm zřejmě vysoký obsah nedegradovaných polysacharidů a digestát má tedy ještě potenciál produkovat bioplyn. Tento závěr je v souladu se současnými technologickými trendy zastřešovat i nádoby, kde se uskládá digestát a využívat i zbytkové produkce bioplynu z již fermentovaného kalu.

5. ZÁVĚR

Byly zjištěny aktivity tří hydrolytických enzymů, α -amylasy, β -glykosidasy a β -xylanasy, v pěti různých vzorcích odebraných z různých fází výroby bioplynu. Těmito vzorky byly: kravský trus z přilehlého kravína, kravská kejda z homogenizačního tanku pro dávkování BPS, kal z vnějšího fermentoru, kal z vnitřního fermentoru a kal digestátu z digestační nádrže.

Aktivita α - amylasy klesá rovnoměrně. Její hodnoty jsou nejvyšší v kravském trusu, díky potravě obsahující vysoký podíl škrobu, a vysoké jsou i v kravské kejdě. V dalších fázích procesu výroby bioplynu je aktivita amylasy již nízká. Oproti β - glykosidase má aktivitu výrazně vyšší v kravském trusu a kravské kejdě. β - glykosidasa je tedy mnohem méně aktivní, ale v posledních třech fázích aktivitu α - amylasy převyšuje. V těchto fázích je její hodnota velice podobná a téměř ustálená. β - xylanasa má v kravské kejdě zanedbatelné hodnoty aktivity, její aktivita rovnoměrně roste a nejvyšší hodnotu má ve vnějším fermentoru, což je způsobené přísunem substrátu obsaženém v kukuřičné siláži. Z výsledků aktivit xylanasy a glukosidasy, je zřejmé že digestát má ještě potenciál k produkci bioplynu. Je tedy vhodné zastřešovat i nádoby, kde se uskládá digestát a využívat i zbytkové produkce bioplynu z již fermentovaného kalu.

6. LITERATURA

¹STRAKA, František a Michal DOHÁNYOS. *Bioplyn: [příručka pro výuku, projekci a provoz bioplynových systémů]*. 2., rozš. a dopl. vyd. Praha, GAS 2006.

²CIRNE, D.G. - LEHTOMAKI, A. - BJORNSSON, L. - BLACKALL, L.L. Hydrolysis and microbial community analysis in two - stage anaerobic digestion of energy crop. *Journal of Applied Microbiology*, 103:3, 516-527 (2007).

³KYSILKA, Jiří. Metabolismus bakterií: Anaerobní respirace. Dostupné z WWW: <<http://www.biotox.cz/naturstoff/biologie/bi-bakterie.html>> [cit. 15. 4. 2014]

⁴KAJAN, Miroslav. Zpracování odpadů na bioplyn. Dostupné z WWW: <<http://naschov.cz/zpracovani-odpadu-na-bioplyn/>> [cit. 1. 3. 2014]

⁵Co je to bioplynová stanice? Dostupné z WWW: <http://www.enviweb.cz/page/co_je_to_bioplynka> [cit. 16. 2. 2014]

⁶DOHÁNYOS, Michal: Anaerobní reaktor není černou skřínkou - teoretické základy anaerobní fermentace. *Biom.cz* 2008-11-17. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/anaerobni-reaktor-neni-cernou-skrinkou-teoreticke-zaklady-anaerobni-fermentace>> [cit. 16. 1. 2014]

⁷KRAUSE, L. - DIAZ, N.N. - EDWARDS, R.A. - AND 10 OTHERS. Taxonomic composition and gene content of a methane - producing microbial community isolated from a biogasreactor. *Journal of Biotechnology*, 136:1-2, 91-101 (2008)

⁸ VOLUME EDITORS, Carl R. Archabacteria. Oxford, Elsevier Science 1985, VIII.

⁹ JIRSÁK, Alois, Podtyp: Článek v měsíčníku; Využití cukrovky k produkci bioplynu. 2010. Syninfo, č. 9, s. 14-16.

¹⁰ *Biochemie: základní kurz*. 4. vyd. Praha: Karolinum, 2009.

¹¹ *Enzymatická hydrolýza sacharidů a proteinů*. Zlín, 2009. Dostupné z WWW:
<http://dspace.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/10015/valenta_2009_bp.pdf?sequence=1>.

Bakalářská práce. UTB ve Zlíně , Fakulta technologická

¹² Davies, G., & Henrissat, B.: Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3:9, 853–859 (1995)

¹³ Rivera, M. H., Lopez-Munguia, a., Soberon, X., & Saab-Rincon, G.: Amylase from *Bacillus licheniformis* mutants near to the catalytic site: effects on hydrolytic and transglycosylation activity. *Protein Engineering Design and Selection*, 16:7, 505–514 (2003)

¹⁴ Wong, K. K., Tan, L. U., & Saddler, J. N.: Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiological Reviews*, 52:3, 305–17 (1988).

¹⁵ Barrett, T., Suresh, C. G., Tolley, S. P., Dodson, E. J., & Hughes, M. a.: The crystal structure of a cyanogenic beta-glucosidase from white clover, a family 1 glycosyl hydrolase. *Structure (London, England : 1993)*, 3(9), 951–60 (1995).

¹⁶ Wang, M., Tomb, J.-F., & Ferry, J. G.: Electron transport in acetate-grown *Methanosarcina acetivorans*. *BMC Microbiology*, 11(1), 165 (2011).

¹⁷ Schaumann: Tvorba bioplynu. Dostupné z WWW: <<http://bioplyn.schaumann.cz/vyroba/vznik-bioplynu/>> [cit. 2014-05-30]

¹⁸ Wikiedia: The Free Encyclopedia. Amylase: Salivary of alpha-amylase. Dostupné z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Salivary_alpha-amylase_1SMD.png> [cit. 2014-05-30]

¹⁹ Protopedia: Life in 3D. BRETEAU, Muriel, Michal HAREL, Alexander BERCHANSKY a David CANNER. Beta-glucosidase: crystal structure of beta-glucosidase Dostupné z WWW: <<http://proteopedia.org/wiki/index.php/Beta-glucosidase>> [cit. 2014-05-30].

²⁰ 1. Schmidt, A., Schlacher, A., Steiner, W., Schwab, H. & Kratky, C. Structure of the xylanase from *Penicillium simplicissimum*. *Protein Sci.* 7, 2081–2088 (1998)

PASTOREK, Zdeněk: Bioplyn – užitečný zdroj energie nebo riskantní způsob podnikání. *Biom.cz* 2008. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/bioplyn-uzitecny-zdroj-energie-nebo-riskantni-zpusob-podnikani>> [cit. 15. 3. 2014]

BAČÍK, Ondřej: Bioplynové stanice: technologie celonárodního významu. *Biom.cz* 2008. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/bioplynove-stanice-technologie-celonarodniho-vyznamu>> [cit. 12. 3. 2014]

Mapa bioplynových stanic. Dostupné z WWW: <<http://www.czba.cz/mapa-bioplynovych-stanic>> [cit. 16. 2. 2014]